



B28

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/16, A61K 38/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/29190 (43) Date de publication internationale: 2 novembre 1995 (02.11.95)
-----------------------------------------------------------------------------------------	--	----	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00528 (22) Date de dépôt international: 21 avril 1995 (21.04.95)	(81) Etats désignés: AU, CA, CN, JP, KR, NZ, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Données relatives à la priorité: 94/04895 22 avril 1994 (22.04.94) FR	Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(71) Déposant: INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR).	
(72) Inventeurs: HOVANESSIAN, Ara; 124, avenue du Général Leclerc, F-92540 Bourg-la-Reine (FR). CALLEBAUT, Christian; 2 bis, rue de Nice, F-75011 Paris (FR). KRUST, Bernard; 7, rue de Madagascar, F-75012 Paris (FR). JACOTOT, Etienne; 25, rue des Apennins, F-75017 Paris (FR). MULLER, Sylviane; 15, avenue de la Forêt-Noire, F-67000 Strasbourg (FR). BRIAND, Jean-Paul; 22, rue des Balaïeurs, F-67000 Strasbourg (FR). GUICHARD, Gilles; 5, rue de l'Arc-en-Ciel, F-67000 Strasbourg (FR).	
(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).	

(54) Title: MULTIREPRESENTATION OF A PEPTIDE ANALOGUE OF THE DPPIV SUBSTRATE, ESPECIALLY OF THE KPR TYPE, TO INHIBIT THE ENTRY OF HIV IN CELLS

(54) Titre: MULTIREPRESENTATION D'UN ANALOGUE PEPTIDIQUE DU SUBSTRAT DE LA DPPIV, NOTAMMENT DE TYPE KPR, AFIN D'INHIBER L'ENTREE DU HIV DANS LES CELLULES

(57) Abstract

Molecule comprising a plurality of repeat patterns, especially of the KPR type, which are recognizable by an ectoprotein (on the cell surface) in particular by the CD26 receptor (also known as the DPPIV enzyme). Said patterns are all carried by a peptide matrix enabling their multiple presentation to the enzyme and having an affinity for the latter. Said molecule is the active ingredient of a composition inhibiting the entry of HIV in cells, in particular, for the treatment of a retrovirus-induced infection.

(57) Abrégé

L'invention concerne une molécule comportant une pluralité des motifs répétés, notamment du type KPR, susceptibles d'être reconnus par une ectoprotéine (à la surface des cellules) notamment par le récepteur CD26 (encore appelé enzyme DPPIV) ces motifs étant tous portés par une matrice peptidique autorisant leur présentation multiple à l'enzyme et présentant une affinité pour celle-ci. Cette molécule constitue le principe actif d'une composition inhibant l'entrée de HIV dans des cellules, notamment pour le traitement d'une infection due à ce rétrovirus.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

MULTIREPRESENTATION D'UN ANALOGUE PEPTIDIQUE DU SUBSTRAT DE LA DPPIV, NOTAMMENT DE TYPE KPR, AFIN D'INHIBER L'ENTREE DU HIV DANS LES CELLULES

La présente demande concerne des inhibiteurs de l'infection par un rétrovirus HIV, comportant un analogue peptidique du substrat de la DPPIV ou/et des motifs conservés dans la boucle V3 de la glycoprotéine d'enveloppe d'un rétrovirus du type HIV.

Le virus humain de l'immuno-déficience (HIV) est l'agent étiologique du syndrome d'immuno-déficience acquise (SIDA) et de troubles qui lui sont apparentés. Jusqu'à présent deux types distincts mais apparentés de rétrovirus, le type HIV-1 et le type HIV-2 ont été identifiés. L'infection des lymphocytes T CD4+, des monocytes et des macrophages par HIV, nécessite l'interaction des produits du gène env du virus avec le récepteur CD4 cellulaire (Klatzman D, et al. Nature 1984 ; 312:767-768).

Le gène env de HIV code pour une polyprotéine précurseur qui est clivée par une protéase cellulaire, conduisant à la production de glycoprotéines extra-cellulaires ou de surface (SU) et transmembranaires (TM) (Eiden LE, et al. Immunol. Today 1992 ; 13:201-206). La protéine de surface, par le biais d'interactions non covalentes avec la protéine transmembranaire est exposée à la surface des cellules infectées ou à la surface des particules virales.

Le récepteur CD4 est une glycoprotéine composée d'une région extracellulaire amino-terminale contenant quatre domaines apparentés à la famille des immunoglobulines et d'une région carboxy-terminale contenant les domaines transmembranaire et cytoplasmique (Eiden et al). Le premier domaine amino-terminal de la molécule CD4 apparaît être le site principal de liaison des protéines de surface de HIV. En conséquence, cette liaison induit un changement de

conformation du complexe SU-TM (complexe formé par les glycoprotéines de surface et transmembranaires) permettant l'interaction du domaine amino-terminal de la protéine transmembranaire avec la membrane cellulaire, causant ainsi la fusion des membranes virale et cellulaire (Marsh M, et al Immunol. Today 1988 ; 8:369-371) ; Eiden LE et al. Immunol. Today 1992 ; 13:201-206 ; Putney S. et al TIBS 1992 ; 17:191-196). Cependant avant la fusion, la protéine de surface pourrait subir une modification par clivage protéolytique, qui dans le cas de la protéine de surface de HIV-1 (GP120) semble -même si la preuve directe n'en a pas encore été rapportée- avoir lieu au niveau du troisième domaine variable, communément appelé "boucle V3", c'est-à-dire le domaine principal de neutralisation (PND) (Moore JP, et al AIDS 1991 ; 5:S21-S33).

Différentes observations ont jusqu'à présent permis de penser que la boucle V3 joue un rôle critique dans l'infection par HIV-1 :

- 1) Des anticorps neutralisants produits naturellement chez des patients séropositifs pour HIV-1 sont principalement dirigés contre la boucle V3 (Goudsmit J, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988 ; 85:4478-4482),
- 2) Des anticorps monoclonaux spécifiques de la boucle V3 n'affectent pas la liaison de la gp120 au récepteur CD4 mais bloquent le processus de fusion (Kinney-Thomas E, et al. AIDS 1988 ; 2:25-29) ;
- 3) Des mutations dans la boucle V3 génèrent des virions dont le caractère infectieux est réduit (Grimaila RJ, et al. J. Virol. 1992 ; 66:1875-1883) ;
- 4) Des mutations dans la boucle V3 modifient le tropisme cellulaire (Chesebro B, et al. J. Virol. 1992 ; 66:6547-6554) et suscitent une modification dans le phénotype de HIV en tant que virus induisant un syncytium ou n'induisant pas un syncytium (De Jong JJ, et al. J. Virol. 1992 ; 66:6777-6780).

La boucle V3 contient de 35 à 41 acides aminés dont les cystéines aux deux extrémités sont reliées, par un pont disulfure formant une boucle. La boucle V3 contient des résidus basiques conservés et en outre la séquence à proximité des cystéines liées, est similaire dans la plupart des isolats. (Clements GJ, et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1991 ; 7:3-16). Par conséquent, il semble qu'il existe une pression de sélection pour conserver les séquences spécifiques dans la boucle V3. Les anticorps monoclonaux dirigés contre des peptides (15-mer) représentant le sommet ("crown") de la boucle V3 ont la capacité de neutraliser HIV-1 (Langedijk JPM, et al. J. Gen. Virol. 1991 ; 72:2519-2526), cela suggère que les résidus d'acides aminés du sommet de la boucle sont impliqués dans les interactions fonctionnelles de la boucle V3.

Jusqu'à présent aucune preuve directe n'a pu être établie concernant le fait que le clivage de la boucle V3 serait essentiel pour l'infection par HIV, bien que la gp120 purifiée ait pu être clivée en fragments de 50 et 70 kDa par différentes protéases : la trombine et la tryptase clivent le site tryptique (GPGR + AFVT), alors que la cathepsine E clive un site chymotrypsine-like (GPGRAF + VT) (Clements GJ, et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1991 ; 7:3-16).

Les inventeurs se sont intéressés à une séquence particulière de la boucle V3 de la glycoprotéine de surface de l'enveloppe du rétrovirus HIV-1, distincte de celles qui ont fait l'objet d'expériences dans l'art antérieur, et aux séquences correspondantes des rétrovirus HIV-2 et SIV. Ils ont observé qu'un très grand nombre d'isolats identifiés de HIV, notamment HIV-1 (plus de 90%) présentent un motif peptidique constitué par la séquence d'acides aminés Gly-Pro-Gly (Glycine - Proline - Glycine ou selon le code à une lettre GPG) et plus particulièrement un motif Gly-Pro, conservé. Ce motif GP ou GPG reste en outre inchangé in

vivo pendant plusieurs années chez des individus infectés par HIV-1, alors que d'autres substitutions apparaissent dans la boucle V3 (Holmback et coll. J. Virol. 1993, 67:1612-1619).

De plus, l'ensemble des isolats identifiés de HIV-1, HIV-2 et SIV présentent à l'extrémité N-terminale de la boucle V3 un motif dipeptidique conservé RP (Arginine - Proline). Par ailleurs, pour HIV-2 et SIV, on trouve aussi un motif dipeptidique conservé RP (Arginine-Proline) ou KP (Lysine- Proline), à l'extrémité C-terminale de la boucle V3. Par ailleurs, pour SIV MND, on trouve aussi un motif dipeptidique EP (Acide glutamique - Proline) dans la boucle V3.

En dehors de la boucle V3, dans le cas de HIV-1, on trouve plusieurs motifs conservés, par exemple les séquences IPI (Isoleucine-Proline-Isoleucine), GPC (Glycine-Proline-Cystéine), PPG(Proline-Proline-Glycine), situés respectivement aux acides aminés 185 et 208, de SU et 411 de TM, par rapport à la séquence consensus de Myers et al (1992).

Les inventeurs ont démontré qu'une protéine cellulaire de surface interagit avec les glycoprotéines de l'enveloppe de HIV ou de SIV, en particulier au niveau de la boucle V3 et est susceptible de la clivage. Ce clivage aurait lieu en un site non identifié comme tel jusqu'à la présente invention. La protéine cellulaire de surface est la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) également appelée antigène ou récepteur CD26 (Barclay AN, et al. (1993). Facts book. London : Harcourt Brace Jovanich). Dans la littérature, la DPPIV/CD26 est également appelée : DPIV, DAPIV, SGP-115/107, Tal et Ta103. La DPPIV est une protéase de surface cellulaire (EC 3.4.14.5) qui possède en général une activité d'exopeptidase et dans certaines conditions une activité d'endopeptidase (Nagatsu T, et al. Anal. Biochem. 1976 ; 74:466-476 - Kudo M, et al J.

Biochem. 1985 ; 97:1211-1218 - Kenny AJ, et al. Biochem. J. 1976 ; 155:169-182). Son activité enzymatique peut être testée par le clivage de dipeptides synthétiques couplés au substrat chromogène p-nitroanilide (para-nitroanilide), ces peptides ayant une séquence X-Pro-p-nitroanilide, pour produire un peptide X-Pro et de la p-nitroaniline (Nagatsu T, et al. Anal. Biochem 1976 ; 74:466-476) X pouvant être un résidu acide aminé, notamment Glycine (Gly), Alanine (Ala), Lysine (Lys), Arginine (Arg), Acide Glutamique (Glu), Acide Aspartique (Asp) ou même Proline (Pro).

L'antigène CD26 est largement exprimé sous la forme d'une glycoprotéine transmembranaire de 110 à 120 kDa, qui est identique à la sérine protéase de surface cellulaire appelée dipeptidyl peptidase IV. Cette enzyme qui est généralement considérée comme une exopeptidase, clive des dipeptides dans la partie amino-terminale de substrats polypeptidiques, dès lors que l'avant-dernier résidu est un résidu proline ; c'est-à-dire que cette enzyme permet le clivage de X-P-polypeptide, P étant un résidu Proline, lorsque X est un acide aminé N-terminal libre (Kudo M, et al. J. Biochem. 1985 ; 97:1211-1218). En outre, la DPPIV a été décrite comme capable de catalyser un clivage "endopeptidase-like", après un motif dipeptidique "GP-like" au sein de peptides synthétiques (Kenny AJ, et al. Biochem. J. 1976 ; 155:169-182) et de se fixer au collagène (Beauvois B, et al. I. Marcel Dekker (Eds.) New York, 1991). La DPPIV lie le collagène mais cette liaison de la DPPIV au collagène n'affecte pas son activité enzymatique (Hanski C, et al. Exp. Cell Res. 1988 ; 178:64-72), suggérant ainsi l'existence de sites d'accrochage et catalytique dans différents domaines de DPPIV/CD26.

La DPPIV est une glycoprotéine comportant plusieurs chaînes oligosaccharidiques liées à des résidus N. La séquence hydrophobe près de l'extrémité

amino-terminale (peptide signal) de cette ectoenzyme, fonctionne comme un domaine d'ancre à la membrane, les 6 acides aminés N-terminaux formant un domaine cytoplasmique et l'extrémité carboxy-terminale de la protéine constituant le domaine extracellulaire (Ogata S, et al. J. Biol. Chem. 1989 ; 264:3596-3601 - Hong W, et al. J. Cell Biol. 1990 ; 111:323-328). Cette enzyme existe dans une grande variété de tissus y compris dans des organes lymphoïdes et non-lymphoïdes (Gorrel MD, et al. Cell. Immunol. 1991 ; 134:205-215). Elle est exprimée sur les membranes apicales de cellules épithéliales (bordures en brosse et surfaces canaliculaires), endothéliales, certains lymphocytes T, des cellules folliculaires dendritiques et des macrophages (Gorrel MD, et al Cell. Immunol. 1991 ; 134:205-215 - McCaughan et al. 1990 Hepatology 11, 547-558. - Sannes PL, et al J. Histochem. Cytochem. 1983 ; 31:684-690). L'activité enzymatique a été détectée sur différentes lignées cellulaires humaines d'origine T et B, de même que sur des monocytes du sang périphérique (Beauvois B, et al. I. Marcel Dekker (Eds.) New York, 1991). L'expression de DPPIV/CD26 est faible dans les lymphocytes T au repos, mais elle augmente considérablement après leur activation; pour cette raison, DPPIV/CD26 est considéré comme un antigène d'activation des lymphocytes T.

On utilisera indifféremment les expressions DPPIV ou CD26 dans la suite du texte.

L'identification d'un nouveau mécanisme impliquant le récepteur CD26 comme médiateur de l'infection chez l'homme par un rétrovirus du SIDA, et plus particulièrement son implication dans l'entrée du rétrovirus dans les cellules telles que les lymphocytes T, les monocytes et les macrophages, permet de définir de nouveaux moyens pour lutter contre l'infection par un rétrovirus HIV ou SIV, et en particulier donne accès

à de nouveaux inhibiteurs de l'infection des cellules par le rétrovirus.

Les inventeurs ont plus particulièrement montré que la DPPIV est un co-récepteur pour HIV, qui est susceptible de lier la boucle V3, et/ou d'autres régions dans les glycoprotéines de l'enveloppe virale SU et TM. Cette étape concernant l'interaction du complexe SU/TM avec DPPIV/CD26 est essentielle pour la pénétration de HIV dans les cellules T CD4.

L'invention a donc pour objet des inhibiteurs de l'infection par un rétrovirus HIV, comportant une pluralité de motifs susceptibles d'être reconnus par une ectoprotéine (à la surface des cellules) notamment par le récepteur CD26 (encore appelé enzyme DPPIV) ces motifs étant tous portés par une matrice peptidique ou non autorisant leur présentation multiple à l'enzyme. Dans ce qui suit, il sera fait référence à l'ensemble de ces motifs ainsi présentés à l'enzyme sous l'expression "motifs répétés".

La matrice permettant la présentation multiple d'un motif choisi, est définie par rapport à sa capacité à rendre accessible le susdit motif.

Il est important de remarquer que l'expression "peptidique(s)", telle qu'utilisée dans le présent contexte, qu'il s'agisse des "motifs répétés peptidiques" ou de la "matrice peptidique", s'entend comme couvrant tant des molécules purement peptidiques (en tant qu'elles sont à base de résidus d'acides aminés naturels) que des molécules dérivées des précédentes par remplacement de tout ou partie de ses résidus d'acides aminés naturels par des isomères optiques de ces acides aminés naturels ou même par des groupes "non peptidiques" (conduisant par exemple à des "pseudo-peptides"), dès lors que ces remplacements n'entraînent pas une altération sensible des propriétés pertinentes desdits motifs répétés (notamment leur capacité à être reconnus par l'enzyme DPPIV) ou de la

matrice (notamment capacité de présentation desdits motifs répétés à l'enzyme).

Selon un premier mode de réalisation des produits de l'invention la matrice peptidique portant les "motifs répétés" contient des résidus d'acides aminés possédant une fonction réactive non engagée dans une liaison peptidique avec des résidus voisins d'acides aminés, ces fonctions réactives intervenant dans la fixation desdits motifs répétés sur cette matrice. De préférence, la matrice peptidique comprend des résidus d'acides aminés de type lysine (K), les susdits motifs répétés étant alors greffés sur les groupes epsilon-amino d'une partie au moins de ces résidus lysine.

D'autres résidus d'acides aminés peuvent également être mis en oeuvre pour le greffage des susdits motifs répétés, tels que l'arginine ou encore des résidus glutamyle qui porte^{nt} une fonction carboxyle non engagée dans les liaisons peptidiques avec d'autres acides aminés de la matrice.

La matrice peut être synthétique et par conséquent préparée par synthèse chimique notamment en utilisant la synthèse en phase solide telle que décrite par Merrifield.

Une première molécule intéressante dans le cadre de la réalisation de l'invention est par exemple caractérisée en ce que la matrice peptidique comprend l'enchaînement d'acides aminés suivant : K X₁ K X₂ X₃ dans lequel X₁ est, de préférence, la lysine, la valine, lalanine ou l'acide glutamique ou l'isoleucine, X₂ et X₃ représentent la glycine ou la proline et sont différents l'un de l'autre.

Les motifs répétés peuvent dans ce cas être liés aux fonctions ϵ -amino des résidus lysine, notamment par des liaisons peptidiques, et peuvent être présentés dans un même plan ou au contraire dans des plans différents. De même ces motifs peuvent être liés du

même côté de la matrice par rapport au résidu lysine ou de façon opposée.

Le résidu d'acides aminés X_1 peut, le cas échéant, être supprimé.

D'autres matrices peptidiques intéressantes pour la réalisation des molécules de l'invention, comprennent un enchaînement d'acides aminés choisi parmi les séquences suivantes

```

K X1 K G P
K X1 K K G P
K X1 K G P K X4 K
K X1 K G P K X4 K G C,
K X1 K G G K X4 K G C,
K K
| |
K X1 K G P
K X1 K P G
K X1 K K P G
K X1 K K G C
K X1 K P G K X4 K
K X1 K P G K X4 K G C
K K
| |
K X1 K P G
K X1 K X4 K X1 K
K X1 K X4 K X1 K G C

```

dans lesquels X_1 est facultatif et peut être la lysine, la valine, l'alanine, l'acide glutamique ou l'isoleucine et X_4 est facultatif et peut être l'acide glutamique, la valine, l'alanine ou l'isoleucine.

Ces matrices permettent la présentation de l'espace selon des configurations variées des motifs répétés.

La présence d'un résidu C à l'extrémité COOH-terminale, et/ou de résidus G et C au niveau de la matrice permet le couplage spécifique éventuel à une structure de type "carrier" ou à des liposomes.

Ainsi les motifs répétés peuvent être liés au résidu lysine suivant un plan, certains se trouvant le cas échéant perpendiculaires les uns par rapport aux autres ou de chaque côté de la matrice.

De préférence, les acides aminés contenus dans la matrice peptidique sont sous la forme dextrogyre.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les liaisons peptidiques entre les acides aminés de la matrice sont modifiées notamment pour améliorer leur résistance à l'hydrolyse par les protéases in vivo.

Le nombre de motifs répétés liés au résidus lysine de la matrice peut varier considérablement.

Ce nombre peut être déterminé en fonction du nombre de résidus lysine présents sur la matrice peptidique et peut être adapté de façon à optimiser leur capacité à inhiber l'entrée du virus dans les lymphocytes in vivo, et en tenant compte de l'influence de la présence d'un nombre accru de motifs sur l'éventuelle toxicité in vivo des molécules ainsi obtenues. Avantageusement, le nombre de motifs répétés présentés par la matrice est compris entre 2 et 8, de préférence entre 4 et 6 motifs, par exemple 5 motifs.

Le cas échéant, il sera tenu compte du nombre d'acides aminés contenus dans le motif répété pour déterminer le nombre de motifs liés à la matrice peptidique.

Les modifications des liaisons entre les acides aminés des motifs répétés et/ou de la matrice peptidique peuvent être de différentes natures. Une modification appropriée peut être réalisée au niveau de la liaison peptidique, afin d'empêcher le clivage de cette liaison et donc afin de diminuer ou de supprimer la sensibilité aux peptidases.

Les techniques habituelles de modification des liaisons peptidiques peuvent être mises en oeuvre.

On citera notamment sans caractère limitatif les modifications de la liaison peptidique -CONH- conduisant à la formation d'une liaison réduite (CH_2NH), rétro inverso (NHCO), méthylène-oxy ($\text{CH}_2\text{-O}$), thiométhylène ($\text{CH}_2\text{-S}$), carba (CH_2CH_2), cétométhylène (CO-CH₂), hydroxyéthylène (CHOH-CH₂) ou Aza (N-N).

Le cas échéant on pourra préférer l'utilisation dans le cadre de l'invention des énantiomères D plutôt que des molécules ayant une configuration L.

Les motifs répétés préférés utilisés pour réaliser les molécules de l'invention devront renfermer au moins deux et avantageusement trois charges positives que l'on pourra choisir parmi les possibilités suivantes :

- le groupement α , NH₂ du motif
- le groupement α , NH₂ de l' α aminohexanoic acid
- le groupement ϵ aminé de la lysine et le groupement δ aminé de l'ornithine et plus généralement les groupements α , β , γ , δ et ϵ aminés (acide α , γ diaminobutyrique ; acide γ , β diamino propionique)
- le groupement guanidino de l'arginine.

Avantageusement ces deux charges seront séparées par au moins un résidu acide aminé neutre tel que Gly, Pro, Ala. Les motifs auront par exemple pour séquence, RP, KP, PK, PR, RK, KR, KPR, RPK, PKR, PRK, KER, KGQ, KGR, RPR, RPG, AHxPR, pyrKR, RPGR, KPGR, KPRG, GPGR, IPIG, GPGRAF, KRPGNK, RPGNK, KRPRQ, KPRQAG

Les séquences ci-après désignées sont décrites au moyen du code dit à une lettre utilisé pour désigner les acides aminés selon le tableau suivant :

12

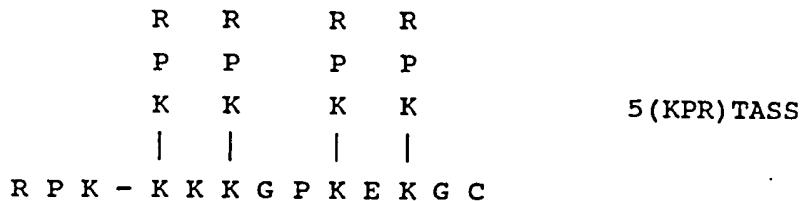
Code à une lettre Acide Aminé

A	Alanine
R	Arginine
N	Asparagine
D	Acide Aspartique
C	Cystéine
Q	Glutamine
E	Acide Glutamique
G	Glycine
H	Histidine
I	Isoleucine
L	Leucine
K	Lysine
M	Méthionine
F	Phényalanine
P	Proline
S	Sérine
T	Thréonine
W	Thryptophane
Y	Tyrosine
V	Valine
AHx	Acide α aminohexanoïque
pyr	Acide pyroglutamique

Pour les besoins de cette description on a eu (ou aura encore) recours au "code" suivant :

X N'importe quel acide aminé ou un acide aminé variable

Une molécule particulièrement préférée (ne faisant intervenir que des "vraies" liaisons peptidiques) pour la réalisation de l'invention répond à la formule suivante :



Selon une variante, les motifs répétés liés aux résidus lysine de la matrice peptidique peuvent être semblables ou de nature différente.

Ainsi on pourra tenir compte dans le choix des motifs répétés liés à la matrice peptidique des variations de la séquence de la boucle V3 de différents isolats du rétrovirus HIV.

De plus, ces motifs répétés peuvent être choisis de façon telle qu'ils comprennent à la fois un épitope B et un épitope T de la glycoprotéine externe d'enveloppe d'un rétrovirus HIV.

Selon une autre variante de réalisation de l'invention, la molécule est caractérisée en ce que la matrice peptidique est remplacée par une molécule fonctionnellement équivalente choisie parmi les polyamines, par exemple le Tris (2-aminoéthyle) amine ou des dendrimères (R. Wolf, Fréquence Chimie p. 13-17, Molécules de grande taille).

L'invention a par ailleurs pour objet une composition susceptible d'inhiber l'infection due à un rétrovirus humain de type HIV, notamment de type HIV-1 ou HIV-2, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, une molécule ci-dessus définie.

Une telle composition est en particulier définie par sa capacité à inhiber l'interaction entre le récepteur cellulaire CD26 (DPPIV) et la glycoprotéine externe d'enveloppe d'un rétrovirus du type HIV, cette interaction manifestant l'incapacité alors acquise par le rétrovirus à pénétrer dans les lymphocytes CD4, comme l'atteste l'absence de formation de syncitia et d'induction de l'apoptose, comme on l'observe dans des cultures témoins. Il y lieu de noter que le mécanisme

d'action des inhibiteurs selon l'invention ne fait normalement pas intervenir une inhibition de l'activité enzymatique de la DDPIV, laquelle n'est normalement pas affectée.

L'invention vise également l'utilisation d'une molécule telle que définie précédemment pour la préparation d'un médicament pour le traitement d'une infection due à un rétrovirus humain de type HIV, notamment en empêchant la fusion de membranes cellulaires.

D'une façon générale, entrent dans le cadre de l'invention une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif une molécule telle que définie ci-dessus.

Cette composition pharmaceutique peut être utilisée pour le traitement ou la prévention de l'infection par le rétrovirus HIV, notamment en tant que composition immunogène notamment en tant que vaccin.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les exemples et les figures qui suivent.

Exemples :

On connaît dans l'état de la technique les molécules du type TASP (template assembled synthetic protein) développées pour transférer les caractéristiques spécifiques d'une enzyme à des molécules facilement accessibles et ainsi pour construire de nouvelles protéines et enzymes (Mutter M. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 24 (1985) 639-653).

Sur cette base, une construction a été définie et synthétisée, que l'on a appelée molécule TASS (en anglais, "template assembled synthetic substrate").

Dans une molécule de ce type, la matrice est utilisée pour former une région d'ancrage covalent d'un peptide (par exemple le peptide K-P-R) qui inhibe, en

temps que monomère à une molarité relativement forte (10 mM), l'entrée de HIV dans les cellules CD4+.

a) Structure de la molécule

R R R R

P P P P

K K K K

| | | |

RPK-KKKGPKEKGC

b) Réactifs chimiques

Le dichlorométhane (DCM) et l'acide trifluoroacétique (TFA) ont été obtenus sous forme redistillée auprès de Neosystem (Strasbourg, France).

Le N,N-diméthylformamide (DMF) et le diisopropyléthylamine (DIEA) ont été achetés auprès de SDS (Peypin, France).

Le tert-butyl-methyl-ether (MTBE), le benzotriasisolyl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (réactif BOP) et le hydroxybenzotriazole (HOBt) proviennent de Fluka (Mulhouse, France). Les acides aminés protégés proviennent de Neosystem (Strasbourg, France). La résine PAM Boc Cys (4 Me Bzl) vient de A.B.I. (Roissy, France). Le fluorure d'hydrogène provient de Prodair (Strasbourg, France).

c) Assemblage de la matrice

Boc Boc Boc Boc

| | | |

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Boc K K K G P K E K G C - PAM Résine

| | |

Clz O-CHX 4-MeBzl

L'assemblage de la chaîne peptidique protégée a été réalisé en utilisant la méthode de synthèse en phase solide selon Merrifield (1963, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2153) avec un synthétiseur peptidique à canon

multiple travaillant en mode semi-automatique (Neimark, J. et Briand J.P. (1993) Peptide Res., 6, 219-228). Cent soixante mg (0,1 mmole) de résine PAM Boc Cys (4-MeBzl) (substitution 0,6 meq/g) ont été placés dans un récipient de réaction de 20 ml. La déprotection du groupe protecteur Boc a été réalisée dans 60% de TFA dans du DCM pendant 30 min, puis la résine a été lavée deux fois avec du DCM et trois fois avec 5 ml de DMF. Les acides aminés 2 à 9 utilisés pour construire la matrice ont été protégés en position α -amino avec un groupe Fmoc. Les groupements protecteurs de chaîne latérale utilisés étaient : le cyclohexyle ester (Glu 4), le chlorobenzylloxycarbonyle (Lys 9), le t-butyloxycarbonyle (Lys 3, 5, 8). La lysine en position 10 a été introduite sous forme d'un dérivé Boc Lys Boc. Le cycle utilisé pour l'incorporation de chaque dérivé d'acide aminé est le suivant :

Etape	Réactif	Durée de l'étape	Volume
Déprotection	25% pipéridine / DMF	3 x 4 min	5 ml
Rinçage	5 x DMF	5 x 15 sec	5 ml
Couplage	Fmoc acide aminé 5 eq BOP HoBt DIEA	20 min 5 eq 5 eq 10 eq	2 ml
Rinçage	3 x DMF	3 x 15 sec	5 ml

Le contrôle avec le test à la ninhydrine a montré que tous les couplages étaient complets en 20 min et aucun recouplage n'a été nécessaire.

d) Assemblage multiple du tripeptide KPR sur la matrice

Les groupes protecteurs Boc de la résine PAM de la matrice ont été clivés dans 60% de TFA/DCM pendant 1 min (prélavage) et 30 min, puis la résine a été lavée

avec du DCM et du DMF. La nouvelle substitution de la résine était de 3 meq/g (0,5 mmole de groupes aminés dans le récipient de réaction). L'elongation des chaînes peptidiques a été obtenue en utilisant 4 eq en excès de Fmoc Arg (Pmc), Fmoc Gly et Fmoc Lys (Boc). Le temps de déprotection des groupes de protection Fmoc a été élevé à 3 x 7 min dans 25% d'un mélange pipéridine/DMF. A la fin de la synthèse et après la dernière étape de déprotection, la résine a été lavée avec du DCM et séchée sous azote. Les groupes protecteurs Pmc et Boc des dérivés de l'arginine et de la lysine ont ensuite été clivés avec le réactif de King (King, D. Field, C. et Fields, G. (1990). Int. J. Pept. Protein Res. 36, 255-266) pendant 2h30 et la résine a été lavée à nouveau avec du DCM et séchée sous un flux d'azote.

e) Clivage final en présence de fluorure d'hydrogène

Le peptide fixé à la résine (620 mg) finalement obtenu a été testé avec 10 ml de HF et 1 ml d'anisol à 0°C pendant 45 min. Après le retrait du fluorure d'hydrogène sous vide, la résine a été lavée avec de l'éther et le peptide a été élué avec 8 ml de TFA pur et précipité à nouveau avec du MTBE. Après centrifugation, le culot de centrifugation a été dissous dans 10 ml d'eau et lyophilisé.

f) Analyse et purification de la molécule

L'homogénéité du produit final a été vérifiée au moyen d'une étape analytique sur une colonne en phase inverse du type C18 nucléoside (150 x 4,6 mm) en utilisant un système tampon TEAP. Le gradient linéaire détecté à 201 nm était de 1 à 21% en 20 min.

Après lyophilisation, 190 mg de la molécule ont été obtenus. 100 mg ont été utilisés pour les expériences d'inhibition, 20 mg ont été utilisés pour être couplés à des liposomes et 70 mg ont été fortement purifiés sur une colonne Delta pak C18.

Activité biologique de la molécule 5(KPR)TASS

a) Effet de la molécule 5(KPR)TASS sur l'activité DPP IV

Dans cet essai, l'activité mettant en jeu l'affinité de cette molécule pour que l'enzyme DPPIV n'interfère pas sensiblement avec l'activité enzymatique de la DDPIV, contrairement à l'inhibiteur (ALBA 2) connu pour inhiber cette activité et utilisé à des fins de comparaison, comme en témoignent les résultats des essais comparatifs qui suivent et qui permettent l'appréciation de leurs effets respectifs sur cette activité. Ces effets ont été mesurés par étude du clivage de GP-pNA dans un tampon peptidase, dans les conditions expérimentales décrites par Callebaut et al, 1993, Science, 24 Dec. 1993, appliquées à une lignée de cellules T humaines, CEM, infectée par le virus HIV-1 LAI, et ce en présence de la molécule 5(KPR)TASS et de l'inhibiteur ALBA 2. Les résultats de ces essais apparaissent dans le tableau suivant, relatif aux Valeurs de IC₅₀ des inhibiteurs peptidiques testés, sur l'activité DPP IV

Peptide	Concentration inhibitrice à 50%	
Enzyme solubilisée Enzyme à la surface des cellules		
KPR	0,2 mM	10 mM
5(KPR)TASS	1 mM	5 - 10 mM
ALBA 2	0,2 M	1 M

ALBA 2 : Lys(Z(NO₂)-pyrrololidid HCL
 K: Lys; P: Pro; R: Arg

Comparé à ALBA 2, la molécule 5(KPR)TASS est 5 000 à 10 000 fois moins active pour l'inhibition de l'activité DPP IV.

b) Inhibition de l'entrée de HIV-1 par la molécule 5(KPR)TASS

L'entrée de HIV-1 LAI a été testée par infection de cellules CEM pendant 1 h. Le virus extracellulaire a été éliminé par traitement avec la trypsine et l'internalisation de HIV a été suivie en testant la concentration de p25 (Callebaut et al, 1993, précité).

Inhibition de l'entrée de HIV par 5 (KPR)TASS

Peptide	p25 internalisée pg/10 ⁵ cellules	% Inhibition
Aucun	280	-
KPR 5 mM	156	44
KPR 10mM	45	84
5 (KPR)TASS 10 μ M	175	38
5 (KPR)TASS 25 μ M	111	60
5 (KPR)TASS 50 μ M	53	81
5 (KPR)TASS 100 μ M	27	90
5 (KPR)TASS 200 μ M	< 1	> 99
Héparine 100 μ g/ml	< 1	> 99

Conclusion : la molécule 5 (KPR)TASS est un inhibiteur puissant de l'entrée de HIV. La valeur de la IC₅₀ est d'environ 10 μ M. Ainsi comparé au monomère KPR, 5(KPR)TASS est 500 fois plus actif. On notera que à 200 μ M de 5 (KPR)TASS, l'activité enzymatique DPP IV n'est pas affectée du tout.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux qui ont été rapportés par Schön et coll. 1991, qui ont

constatés que le puissant inhibiteur de l'activité enzymatique de la DDP-IV que représente l'ALBA-2 n'inhibe pas la fonction de la CD26 au cours de l'activation des cellules T.

c) Inhibition de l'infection par HIV-1 par 5 (KPR)TASS

Des cellules CEM ont été incubées (37°C, 30 min) avec différentes concentrations (200, 100, 50, 25 et 5 μ M) de 5 (KPR)TASS avant l'infection avec HIV-1 LAI. Les cellules infectées en présence de l'inhibiteur ont ensuite été cultivées pendant 4 jours et la production de virus a été testée en suivant la concentration de p25 dans le surnageant de culture. La production de HIV a été inhibée de façon considérable par la molécule 5 (KPR)TASS et cette inhibition était dépendante de la dose : plus de 90 % d'inhibition à 20 μ M et autour de 50 % d'inhibition à 5 à 10 μ M. Comme la production du virus était inhibée par 5 (KPR)TASS, la formation de syncytia était également inhibée.

d) 5 (KPR)TASS inhibe la formation de syncytia

Pour démontrer l'effet de 5(KPR) TASS sur la formation syncytia, les cellules CEM ont été d'abord infectées avec HIV-1 LAI avant l'addition de différentes concentrations de 5 (KPR)TASS. La production de virus et la formation de syncytia ont été suivies à 4 jours après l'infection. Comme la molécule 5 (KPR)TASS était ajoutée après l'infection (c'est à dire après l'entrée de HIV dans les cellules), la production de virus n'était pas affectée. Cependant la formation de syncytia était complètement inhibée à 200 μ M, était inhibée à 75% à 100 μ M et à 50% avec 50 μ M de 5 (KPR)TASS.

Ces résultats confirment que 5(KPR)TASS est un inhibiteur de l'entrée, comme cela a été démontré dans la section c (c'est-à-dire en inhibant la fusion des

membranes virales et cellulaires) et montrent de plus que 5(KPR)TASS est aussi un inhibiteur de la formation de syncytia en empêchant la fusion des membranes des cellules infectées avec des cellules voisines.

e) La molécule 5 (KPR)TASS n'a pas d'effet toxique sur la croissance cellulaire

Le nombre de cellules CEM ayant poussé en l'absence ou en présence de 100 μ M de 5 (KPR)TASS était comparable après 3 trois jours de culture.

f) Inhibition de l'infection par HIV-2 et SIV

Les cellules (CEM clone 13 ; CEM 174, HUT 78) ont été incubées (37°C, 30mn) avec différentes concentrations (80, 40, 20 et 10 μ M) de 5 (KPR)TASS avant l'infection avec HIV-2 ROD, HIV-2 EHO ou SIV mac. Les cellules infectées en présence de l'inhibiteur ont ensuite été cultivées pendant 4 jours et la production de virus a été testée en observant l'activité de la transcriptase inverse dans le surnageant de culture. La production de HIV-2 et SIV a été inhibée de façon considérable par la 5 (KPR)TASS. Les doses d'inhibition à 50 % ont été estimées environ à 10-20 μ M de la 5(KPR)TASS.

g) 5(KPR)TASS inhibe l'induction de la mort cellulaire ou l'apoptose

Des cellules chroniquement infectées par le HIV-1 (par exemple, les cellules H9/IIIB ; Resnick et al., 1986, K. Infect. Dis. 154, 1027-1030) à cause de l'expression du complexe gp120/gp41 des glycoprotéines d'enveloppe de HIV, peuvent être utilisées en tant que cellules effectrices pour induire l'apoptose dans des lymphocytes CD4+ (par exemple, les cellules MOLT-4 T4). En l'espace d'une vingtaine d'heures, de la coculture des cellules H9/IIIB dans MOLT-4-T4,

l'apoptose est détectée dans les cellules MOLT-4 (Laurent-Crawford et al. 1992, in "Retrovirus of Human AIDS and Related Diseases, pp.35-41, VIIè Colloque des Cent Gardes). 5(KPR)TASS à une concentration de 50-100 μ M est capable d'inhiber complètement l'induction de la mort cellulaire ou l'apoptose dans les cellules MOLT-4.

h) Des inhibiteurs de l'activité DPP IV ne sont pas nécessairement inhibiteurs de l'entrée du VIH

ALBA 2 (H-Lys-[Z(NO₂)]-pyrrolidide) est un inhibiteur puissant de l'activité DPP IV (Schön et coll., 1991, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 372, 305-311). L'activité de la DPP IV à la surface des cellules est inhibée à 90 % à 20 μ M et à 50 % à 1 μ M. Contrairement à cette inhibition de l'activité enzymatique de la DPP IV, ALBA 2 n'exerce un effet ni sur l'entrée du VIH, ni sur la formation de syncytia, ni sur l'induction de l'apoptose, même à une concentration de 50 μ M. La concentration de 100 μ M est toxique pour les cellules. Au contraire, la molécule 5(KPR)TASS, qui n'exerce qu'un faible effet sur l'activité DPP IV, bloque considérablement l'infection des cellules par le VIH.

Inhibiteur	(IC ₅₀) Activité DPP IV	(IC ₅₀) Inhibition de l'entrée
ALBA 2	1 μ M	pas d'effet à 50 μ M
5(KPR)TASS	5mM	5 μ M

IC₅₀ : dose de l'inhibiteur nécessaire pour une inhibition égale à 50 %

Ces résultats suggèrent que l'activité catalytique de DPP IV/CD26 n'est pas nécessaire pour son fonctionnement dans l'infection des cellules par le VIH. Par ailleurs, la molécule 5(KPR)TASS qui n'affecte pas l'activité à des concentrations inférieures à 1 mM inhibe l'infection virale à plus de 95 % à une dose de 100 μ M et à 50 % à une dose d'environ 5 μ M. Une explication logique de ces résultats est que la molécule 5(KPR)TASS a une forte affinité pour un site dans la DPPIV/CD26 (site d'accrochage) qui devrait être indépendant du site catalytique impliqué dans l'activité enzymatique. Du fait que KPR pourrait servir de substrat suggère aussi que le site catalytique et le site d'accrochage interagissent avec des structures peptidiques similaires.

i) exemple de différents inhibiteurs pour l'infection par le HIV de type 5(KPR)TASS

Les cellules CEM ont été incubées (37°C, 30 min) avant l'infection avec HIV-1 LAI avec différentes concentrations (de 50 à 0,5 μ M). Les cellules infectées en présence de l'inhibiteur ont ensuite été cultivées pendant 4 jours et la production de virus a été évaluée en mesurant la concentration de p25 dans

le surnageant de culture. Le tableau ci-dessous indique la concentration du peptide qui donne une inhibition d'au moins 90% et 50% de la production du virus.

**Concentration du peptide inhibant
la production du HIV**

Peptide	90%	50%
5(KPR)TASS	20 μ M	10 μ M
5(KGR)TASS	50 μ M	N.T.
5(PKR)TASS	50 μ M	N.T.
5(RPK)TASS	10 μ M	1 μ M
5(K φ CH ₂ -N-PR) TASS	1 μ M	0,5 μ M

* La liaison peptidique entre KP est réduite.

N.T. non testé

h) le site de reconnaissance du peptide
5(KPR)TASS dans CD26

Les anticorps 1F7 contre la CD26 (C. Morimoto, DanaFarber Cancer Institute, Boston USA) bloquent l'entrée du virus HIV (Callebaut et al., *Science*, 262, 2045-2050) sans inhiber l'activité enzymatique de la CD26. Ces résultats ont suggéré que le site d'interaction de la CD26 avec l'enveloppe du HIV se situe en dehors du site de reconnaissance du substrat de l'activité peptidase de CD26. Cette suggestion est en accord avec l'action de la peptide 5(KPR)TASS qui à la concentration de 50 μ M inhibe plus de 90 % de l'entrée du virus sans affecter l'activité enzymatique.

Pour démontrer si le site d'action de la 5(KPR)TASS est le même que celui de l'anticorps 1F7, nous avons effectué l'expérience suivante : les cellules MOLT une lignée de lymphocytes T humain (CD4+

et CD26+) ont été incubées (5 min à température ambiante) avec ou sans addition de 50 μ M de 5(KPR)TASS ou 50 μ M de ALBA 2 (qui inhibe l'activité enzymatique mais pas l'entrée du virus). Les anticorps ont été ajoutés ensuite tels que MAb 1F7 anti CD26, MAb BA5 un autre anticorps anti CD26 (Immunotech) qui n'affecte pas l'entrée du HIV, MAb OKT4 anti-CD4 (Ortho Diagnostics Systems), MAb ALB1 anti CD45 (Immunotech) (tyrosine kinase associée avec CD26) et les cellules sont incubées à 4°C pendant 1 h. Les cellules sont ensuite lavées et analysées par FACS (abréviation de l'expression anglaise "Fluorescence- activated cell sorting analysis" ou "analyse par fluorescence de catégories de cellules activées") : voir la figure fournissant les spectres caractéristiques résultant de l'analyse par FACS de la reconnaissance du CD26 (par MAb 1F7 et MAb BA5), CD4 (par MAb OKT4) et CD45 (par MAb ALB1) à la surface des cellules MOLT en l'absence ou en présence de 5 (KPR)TASS (cité comme S13) et ALBA2. Les résultats montrent que 5(KPR)TASS (cité sous le nom S13) inhibe la reconnaissance de CD26 par MAb 1F7 tandis que la reconnaissance de CD26 par MAb BA5 n'est pas affectée, indiquant ainsi que l'épitope de MAb 1F7 est bien le site d'interaction de 5(KPR)TASS. Il est intéressant de noter que ALBA 2 qui n'affecte pas l'entrée du virus ne modifie pas la reconnaissance de la CD26 par l'anticorps 1F7 ou par BA5.

L'effet de 5(KPR)TASS sur l'épitope de MAb 1F7 c'est à dire CD26 est spécifique car la reconnaissance des autres antigènes de surface tels que CD4 et CD26 ne sont pas modifiés par 5(KPR)TASS.

Conclusion

Le complexe glycoprotéine formant l'enveloppe du virus et comportant la protéine de surface SU (gp120) et la protéine transmembranaire TM (gp41), joue un rôle important dans l'infection par le VIH ; la gp120 contient le site de fixation au CD4, et la gp41 le motif peptidique nécessaire au processus de fusion membranaire. L'association non-covalente de la gp120 et la gp41 forme un complexe conformationnel qui est essentiel pour les deux fonctions principales du complexe gp120/41 ; l'entrée du noyau (core) du virus dans les cellules par fusion des membranes virale et cellulaire, et l'induction de l'effet cytopathogène par fusion des membranes des cellules infectées (exprimant le complexe gp120/gp41 à la surface) avec celles des cellules voisines.

L'expression du complexe gp120/gp41 à la surface des cellules infectées conduit à une interaction avec les molécules CD4 des cellules voisines non infectées, qui entraîne un effet cytopathogène caractéristique du VIH (Laurent-Crawford et al., 1993, AIDS Res. Hum. Retroviruses 9, 761-773) : formation de syncytia (cellules multinucléées générées par la fusion des cellules infectées avec les cellules non infectées) et/ou la mort cellulaire par apoptose (fragmentation de la chromatine au niveau des liens internucléosomiques).

Le fait que les différentes fonctions du complexe d'enveloppe gp120/gp41 : 1) l'entrée virale ; 2) la formation des syncytia ; 3) l'induction de l'apoptose sont inhibées par la molécule 5(KPR)TASS suggère que dans ces différentes fonctions du complexe gp120/gp41, cette molécule inhibe l'interaction de la boucle V3 avec une protéine de surface, par exemple, la DPPIV/CD26.

5 (KPR)TASS est un inhibiteur potentiel de l'entrée de HIV et de l'infection. Il présente très

peu d'effet, à supposer qu'il puisse même être constaté, sur l'activité enzymatique DPP IV. Ainsi on peut penser que 5 (KPR)TASS agit principalement sur le site de reconnaissance du substrat (c'est-à-dire la boucle V3 de la gp120) sans affecter le site catalytique de la molécule CD26. Une des explications de l'activité plus importante de 5 (KPR)TASS par rapport au monomère KPR pourrait être trouvée dans le fait que la molécule CD26 existerait sous forme d'un multimère d'où également une présentation également plus efficace d'un multimère de type KPR plus efficace.

Le résidu KPR dans la molécule TASS peut également être remplacé par d'autres peptides pour former des variants de cet inhibiteur, par exemple : RPK, RPR, PKR, KGR.

Le tripeptide KPR est un des motifs conservés dans la boucle V3, précisément trouvé dans la partie C-terminale de la boucle V3 de certains VIH-2. En raison de la présence du dipeptide KP, KPR pourrait servir comme un substrat de l'enzyme DPPIV/CD26. Par ailleurs, nous avons démontré que le tripeptide KPR monomère à 10 mM inhibe l'entrée de VIH et aussi inhibe l'activité de la DPPIV. Sur ces données, nous avons ici démontré que la présentation multimérique de ce tripeptide KPR (par exemple 5(KPR-TASS) augmente considérablement l'efficacité de cette molécule pour inhiber l'entrée de VIH, la formation de syncytia et l'induction de l'apoptose. Mais à la concentration (10-200 μ M) de 5(KPR)TASS quand l'infection virale est inhibée, l'activité enzymatique n'est pas affectée. Ce n'est qu'à une concentration de 1-10mM de 5(KPR)TASS, que l'activité de la DPPIV est inhibée.

Enfin, les peptides de type 5(KPR)TASS semblent interagir avec CD26 dans une région qui constitue l'épitope de l'anticorps monoclonal anti-CD26, MAb 1F7.

Exemple de l'effet inhibiteur de différents peptides synthétiques multimères (correspondant à la molécule TASS ou à des formes modifiées de la molécule TASS), sur l'infection par HIV-1 LAI dans des cellules CEM.

Des cellules CEM ont été incubées (15-30 minutes, 37°C) avec les différents peptides avant l'infection avec la souche HIV-1 LAI (60 minutes, 37°C). Les cellules ont ensuite été centrifugées et suspendues dans un milieu de culture frais contenant les différents inhibiteurs. La formation de syncytia a été suivie au jours 3 et 4 après l'infection (post-infection (p.i)) et les surnageants de cultures ont été testés pour déterminer leur concentration en protéine majeure du noyau (core) de HIV, p24/p25. On a remarqué une très bonne corrélation entre l'inhibition de la formation des syncytia et la production de HIV (c'est-à-dire la concentration de p24/p25).

La matrice de TASS est composée des résidus suivants : KKKGPKEKGC. Comme contrôle, on a utilisé une matrice TASS modifiée dans laquelle le résidu proline (P) avait été modifié par un résidu G conformément à la séquence suivante : KKKGGKEKGC. Cette dernière séquence est dénommée TASS(GG). Une autre molécule TASS modifiée répondant à la séquence KKKKGC a également été utilisée. Dans certains cas, la matrice MAP a été utilisée dans un but de comparaison.

01 **5 (KPR)-TASS**

99% inhibition à 100 μ M
85% inhibition à 25 μ M
25-50% inhibition à 10 μ M

03 **8 (KPRG)-MAP**

93% inhibition à 50 μ M
58% inhibition à 25 μ M
18% inhibition à 10 μ M

05 **8 (RPG)-MAP**

50% inhibition à 100 μ M
8% inhibition à 50 μ M

06 **4 X 2 (KPRG)-TASS**

99% inhibition à 50 μ M
50% inhibition à 10-25 μ M

07 **4 X 2 (IPIG)-TASS**

Pas d'effet à 100 μ M

08 **8 (GPGRAF)-MAP**

98% inhibition à 100 μ M
86% inhibition à 50 μ M

09 **5 (KGR)-TASS**

86-99% inhibition à 50 μ M

010 **8 (KPRG)-TASS**

85% inhibition à 50 μ M
70% inhibition à 25 μ M
50% inhibition à 10 μ M

011 **5 (KPRQAG)-TASS**

Toxique à 100 et 50 μ M
Pas d'effet à 25 μ M

013 **5 (IPIG)-TASS**

Pas d'effet à 100 μ M

014 **2 (KGR)-TASS**

Pas d'effet à 100 μ M

015 **5 (KGR)-TASS (GG)**

Toxique à 100 μ M
90-99% inhibition à 50 μ M
70% inhibition à 25 μ M

016 **5 (PKR)-TASS (GG)**

30

99% inhibition à 50 μ M
75% inhibition à 25 μ M

018 5 (KGQ)-TASS

45% inhibition à 100 μ M
Pas d'effet à 50 μ M

019 5 (KVCH₂-N-PR)-TASS

Cytostatique à 50 μ M (35% de cellules en moins)
99% inhibition à 25 μ M
99% inhibition à 10 μ M
65% inhibition à 1 μ M
50% inhibition à 0.5 μ M

020 5 (acetyleKPR)-TASS

Peut être inhibé de 50% à 10 μ M

021 5 (PKR)-TASS

95% inhibition à 100 μ M
75% ; 60% inhibition à 25 μ M
50% inhibition à 10 μ M

022 5 (G)-TASS

8% inhibition à 100 μ M
Pas d'effet à 50 μ M

023 3 (KPR)-TASS

24% inhibition à 100 μ M
Pas d'effet à 50 μ M

025 5 (RPK)-TASS

99% inhibition à 50 μ M
97% inhibition à 25 μ M
97% inhibition à 10 μ M
50% ; 65% inhibition à 1 μ M
Pas d'effet à 0.5 μ M

027 5 (pyrKR)-TASS

95% inhibition à 50 μ M

31

86% inhibition à 25 μ M
66% inhibition à 10 μ M

028 **5(εAminohexanoylePR)-TASS**
90% inhibition à 50 μ M
67% inhibition à 25 μ M
66% inhibition à 10 μ M

029 **5(KER)-TASS**
67% inhibition à 50 μ M
50% inhibition à 25 μ M
34% inhibition à 10 μ M

030 **5(RK)-TASS**
96% inhibition à 50 μ M
77% inhibition à 25 μ M
58% inhibition à 10 μ M

031 **Hexanoyl 4(RPK)-TASS**
Pas d'effet à 50 μ M

032 **5((D)R(D)P(D)K)-TASS**
98% inhibition à 50 μ M
98% inhibition à 25 μ M
98% inhibition à 10 μ M
82% inhibition à 5 μ M
20% inhibition à 1 μ M

033 **5(RPR)-TASS**
96% inhibition à 50 μ M
95% inhibition à 25 μ M
95% inhibition à 10 μ M
85% inhibition à 5 μ M
10% inhibition à 1 μ M

034 **4(RPK)-TASS**
71% inhibition à 50 μ M
40% inhibition à 25 μ M
24% inhibition à 10 μ M

035 5 (AcRPK)-TASS (αAc: Acetyl CH₃...)

90% inhibition à 50 μM
59% inhibition à 25 μM
20% inhibition à 10 μM

036 5 (RPK)-KKKKGC

98% inhibition à 50 μM
98% inhibition à 25 μM
98% inhibition à 10 μM
60% inhibition à 5 μM
35% inhibition à 1 μM

037 5 (R-ΨCH₂N-PK)-KKKKGC

99% inhibition à 20 μM
99% inhibition à 10 μM
99% inhibition à 5 μM
65% inhibition à 1 μM
50% inhibition à 0.5 μM

038 5 ((D)R-ΨCH₂N-(D)P(D)K)-KKKKGC

99% inhibition à 20 μM
99% inhibition à 10 μM
99% inhibition à 5 μM
82% inhibition à 1 μM
50% inhibition à 0.5 μM

Conclusions :

Ces études structure-fonction suggèrent que la présentation pentavalente des motifs KPR ou RPK correspond à la présentation optimale. La présentation octavalente (voir N° 6 et 10) n'augmente pas l'activité inhibitrice et la présentation trivalente ou tétravalente conduit à une activité d'inhibition faible (voir N° 23 et 24).

Les différentes molécules peptides-TASS sont actives à des concentrations en microgrammes pour bloquer l'entrer de HIV, l'infection et la formation

de syncytium. Avec une infection par HIV-1 LAI à haute dose sur des cellules T de type CEM, la valeur de la concentration inhibitrice à 50% (IC_{50}) pour certaines des molécules (N° 19, 25, 32, 33, 36, 37, 38) est comprise entre 0.5 et 2 μ M.

Caractéristiques du motif inhibiteur :

K - P - R
(1) (2) (3)

D'après les exemples précédents, une formule préférée du motif inhibiteur comporterait les résidus suivants :

- Deux acides aminés devraient être des résidus basiques, par exemple K ou R ; K pouvant être remplacé par R et vice-versa. Ces deux résidus basiques pourraient occuper l'une quelconque des positions 1, 2 ou 3 (voir exemple N°1, 16, 21, 25 et 33).
- Le résidu P pourrait être déléte ou remplacé par un résidu G pour obtenir un motif actif (N°15 et 30) mais le remplacement par un résidu de type E diminuerait l'action inhibitrice (voir N°16).
- Le remplacement d'un résidu basique par un autre résidu hydrophile tel que le résidu Q réduit considérablement l'activité inhibitrice (voir N°18 ; 5(KQG)-TASS).
- Le groupe ϵ amino du résidu K est important puisque l'acétylation de ce groupe réduit considérablement l'action inhibitrice de la molécule (N°20).
- Le groupe α -amino du motif ne joue pas un rôle crucial puisque qu'il peut être acétylé (voir N°35) sans que l'activité inhibitrice soit réduite considérablement. De même l'introduction d'un acide

pyroglutamique à la position 1 n'affecte pas l'activité inhibitrice (voir N°27).

- L'introduction du «aminohexanoyl à la position 1 ne réduit pas l'activité de la molécule (voir 28).

- La construction faite avec l'enantiomère D du motif d'inhibition est aussi active que la construction correspondant à la configuration L du motif inhibiteur (voir N°32).

- La réduction de la liaison peptidique entre l'acide aminé 1 et l'acide aminé 2, accroît considérablement l'action inhibitrice de la molécule (N°19, 37, 38).

REVENDICATIONS

1. Molécule comprenant une pluralité de motifs ou "motifs répétés" susceptibles d'être reconnus par une ectoprotéine (à la surface des cellules) notamment par le récepteur CD26 (encore appelé enzyme DPPIV) ces motifs étant tous portés par une matrice peptidique autorisant leur présentation multiple à l'enzyme et présentant une affinité pour celle-ci.

2. Molécule selon la revendication 1, caractérisée en ce que la matrice peptidique portant les "motifs répétés" contient des résidus d'acides aminés possédant une fonction réactive non engagée dans une liaison peptidique avec des résidus voisins d'acides aminés, ces fonctions réactives intervenant dans la fixation desdits motifs répétés sur cette matrice.

3. Molécule selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend des résidus d'acides aminés de type lysine, les susdits motifs répétés étant alors greffés sur les groupes epsilon-amino d'une partie au moins de ces résidus lysine.

4. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la matrice peptidique comprend l'enchaînement d'acides aminés suivant : K X₁ K X₂ X₃ dans lequel X₁ est la lysine, la valine, lalanine ou l'isoleucine, X₂ et X₃ représentent la glycine ou la proline et sont différents l'un de l'autre.

5. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la matrice peptidique comprend un enchaînement d'acides aminés choisi parmi les séquences suivantes :

K X₁ K G P

K X₁ K K G P

K X₁ K G P K X₄ K

K X₁ K G P K X₄ K G C,

K X₁ K G G K X₄ K G C
 K K
 | |
 K X₁ K G P
 K X₁ K P G
 K X₁ K K P G
 K X₁ K K G C
 K X₁ K P G K X₄ K
 K X₁ K P G K X₄ K G C
 K K
 | |
 K X₁ K P G
 K X₁ K X₄ K X₁ K
 K X₁ K X₄ K X₁ K G C

dans lesquels X₁ est facultatif et peut être la lysine, la valine, l'alanine ou l'isoleucine et X₄ est facultatif et peut être l'acide glutamique, la valine, l'alanine ou l'isoleucine.

6. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les acides aminés de la matrice sont sous forme dextrogyre ou levogyre.

7. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la matrice peptidique comprend entre 2 et 8 motifs répétés, de préférence entre 4 et 6 motifs, notamment 5 motifs.

8. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les liaisons peptidiques entre tout ou partie des acides aminés des motifs sont modifiées de façon à prévenir leur hydrolyse enzymatique.

9. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le motif répété comprend trois acides aminés dont deux sont des résidus basiques, par exemple K et/ou R.

10. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que le motif répété répond à la séquence KPR.

11. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que le motif répété comprend une séquence choisie parmi les suivantes ou correspond à l'une de ces séquences :

RP, KP, PK, PR, RK, KR, KPR, RPK, PKR, PRK.
KER, KGQ, KGR, RPR, RPG, AHxPR, pyrKR, RPGR, KPGR, KPRG, GPGR, IPIG, GPGRAF, KRPGNK, RPGNK, KRPRQ, KPRQAG

12. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule suivante :

R	R	R	R
P	P	P	P
K	K	K	K

R P K - K K K G P K E K G C.

13. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle comprend plusieurs motifs répétés différents.

14. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que la matrice peptidique est remplacée par une molécule fonctionnellement équivalente choisie parmi les polyamines, par exemple le Tris (2 aminoethyle) amine ou les dendrimères.

15. Composition susceptible d'inhiber l'infection due à un rétrovirus humain de type HIV, notamment de type HIV-1 ou HIV-2 ou SIV, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, une molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

16. Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle a la capacité d'inhiber l'interaction entre le récepteur cellulaire CD26 ou DPPIV et la glycoprotéine externe d'enveloppe du

rétrrovirus HIV, de préférence sans affecter l'activité enzymatique de la DPPIV CD26.

17. Utilisation d'une molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour la préparation d'un médicament pour le traitement d'une infection due à un rétrrovirus humain de type HIV.

18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle a la capacité d'inhiber l'entrée des particules du VIH en empêchant la fusion des membranes cellulaire et virale.

19. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle a la capacité d'inhiber la fusion des cellules infectées avec des cellules voisines.

20. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle a la capacité d'inhiber l'induction de la mort cellulaire par l'apoptose en empêchant l'interaction du complexe des glycoprotéines d'enveloppe gp120/gp41 avec les cellules cibles.

21. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, une molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

22. Utilisation d'une molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour la préparation d'un médicament capable d'inhiber l'interaction entre le récepteur cellulaire CD26 ou DPPIV et la glycoprotéine externe d'enveloppe du rétrrovirus HIV.

23. Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif une molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

1 / 2

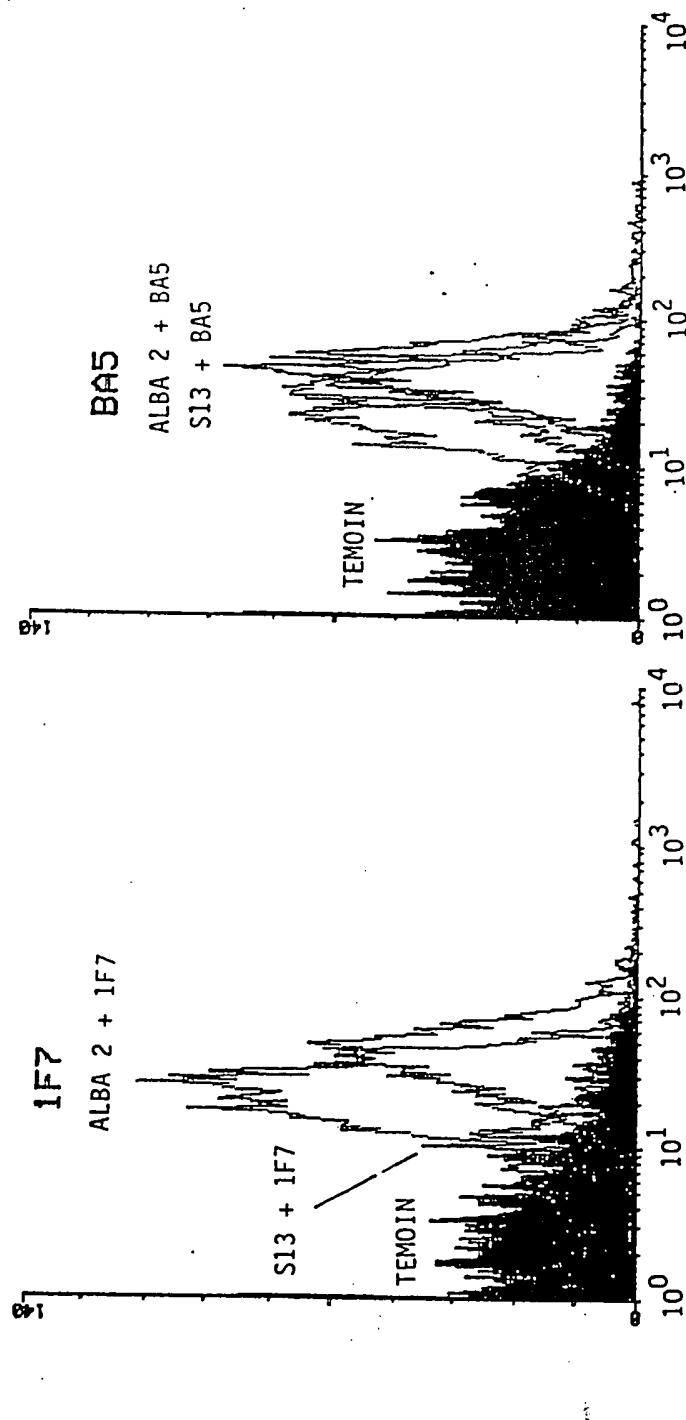
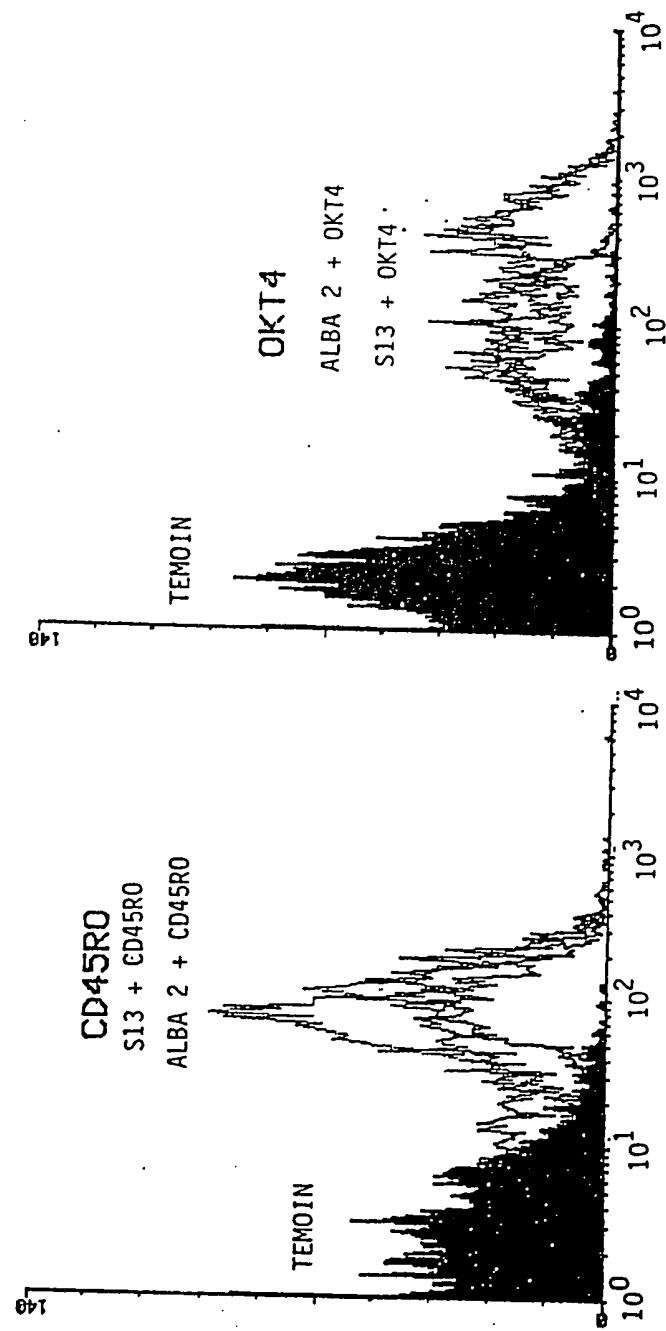


FIGURE 1A

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

2 / 2



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 1B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/FR 95/00528A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/16 A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SCIENCE, vol. 262, no. 5142, 24 December 1993 WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS, pages 2045-2050, C. CALLEBAUT ET AL. 'T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells.' cited in the application see the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-23

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *B* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 August 1995

Date of mailing of the international search report

05.09.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l. Appl. No.

PCT/FR 95/00528

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9507929	23-03-95	AU-B-	7619694	03-04-95
WO-A-9428915	22-12-94	FR-A-	2707169	13-01-95
		FR-A-	2707170	13-01-95
		AU-B-	1030195	03-01-95

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No
PCT/FR 95/00528

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III. SCIENCES DE LA VIE., vol. 316, no. 11, November 1993 PARIS, FRANCE, pages 1381-1387, J. FANTINI ET AL. 'Multi-branched peptides based on the HIV-1 V3 loop consensus motif inhibit HIV-1 and HIV-2 infection in CD4+ and CD4- cells.' see abstract see figure 1 ---	1-23
A	IMMUNOLOGY TODAY, vol. 15, no. 4, April 1994 AMSTERDAM, PAYS BAS, pages 180-184, B. FLEISCHER ET AL. 'CD26: a surface protease involved in T-cell activation.' see page 183, left column, line 19 - line 57 ---	1-23
A	ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR, ACTUAL., vol. 5, no. 1, 1994 PARIS, FRANCE, pages 41-46, C. CALLEBAUT ET AL. 'L'entrée du VIH dans les cellules CD4+ requiert l'antigène de surface CD26.' see the whole document ---	1-23
A	ANTIVIRAL CHEMISTRY AND CHEMOTHERAPY, vol. 5, no. 3, 1994 OXFORD, GRANDE BRETAGNE, pages 195-196, A. BENJOUAD ET AL. 'Multi-branched peptide constructs (MBPC) of the V3-loop of envelope glycoprotein gp120 inhibit human immunodeficiency virus-induced syncytium formation.' see the whole document ---	1-23
P,Y	WO,A,95 07929 (ARMEL SA) 23 March 1995 see claims ---	1-23
P,Y	WO,A,94 28915 (INSTITUT PASTEUR) 22 December 1994 see claims -----	1-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/00528

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07K14/16 A61K38/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>SCIENCE, vol. 262, no. 5142, 24 Décembre 1993 WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS, pages 2045-2050, C. CALLEBAUT ET AL. 'T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells.' cité dans la demande voir le document en entier ---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-23

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 Août 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05.09.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2840, Tx. 31 651 epo nl,
Fax. (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/00528

C(uite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III. SCIENCES DE LA VIE., vol. 316, no. 11, Novembre 1993 PARIS, FRANCE, pages 1381-1387, J. FANTINI ET AL. 'Multi-branched peptides based on the HIV-1 V3 loop consensus motif inhibit HIV-1 and HIV-2 infection in CD4+ and CD4- cells.' voir abrégé voir figure 1 ---	1-23
A	IMMUNOLOGY TODAY, vol. 15, no. 4, Avril 1994 AMSTERDAM, PAYS BAS, pages 180-184, B. FLEISCHER ET AL. 'CD26: a surface protease involved in T-cell activation.' voir page 183, colonne de gauche, ligne 19 - ligne 57 ---	1-23
A	ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR, ACTUAL., vol. 5, no. 1, 1994 PARIS, FRANCE, pages 41-46, C. CALLEBAUT ET AL. 'L'entrée du VIH dans les cellules CD4+ requiert l'antigène de surface CD26.' voir le document en entier ---	1-23
A	ANTIVIRAL CHEMISTRY AND CHEMOTHERAPY, vol. 5, no. 3, 1994 OXFORD, GRANDE BRETAGNE, pages 195-196, A. BENJOUAD ET AL. 'Multi-branched peptide constructs (MBPC) of the V3-loop of envelope glycoprotein gp120 inhibit human immunodeficiency virus-induced syncytium formation.' voir le document en entier ---	1-23
P,Y	WO,A,95 07929 (ARMEL SA) 23 Mars 1995 voir revendications ---	1-23
P,Y	WO,A,94 28915 (INSTITUT PASTEUR) 22 Décembre 1994 voir revendications -----	1-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Doc. Internationale No
PCT/FR 95/00528

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9507929	23-03-95	AU-B-	7619694
WO-A-9428915	22-12-94	FR-A-	2707169
		FR-A-	2707170
		AU-B-	1030195
			13-01-95
			13-01-95
			03-01-95

